Глава 6

Новые пути поиска инновационных лекарств

Фармакология XXI века имеет существенные отличия от фармакологии двадцатилетней давности, так как использует другие научные дисциплины и технологии в своих поисках новых фармацевтических компонентов. Особенно это касается области развития производства и доставки лекарств, научных и технологических преимуществ в области биотехнологии и генной инженерии, геномики, протеомики, информационных технологий, нанотехнологий и наноробототехники, дающих возможность использовать химию и высокие технологии, которые становятся движущей силой в фармацевтических исследованиях [1, 9, 34].

Многие продукты, которые могут влиять на процессы жизнедеятельности на различных уровнях, являются результатом биотехнологической революции. Зачастую они столь высокоэффективны при применении на уровне низких доз, что могут развиваться и использоваться не только как лекарство [3, 4, 5].

Технологическая революция в биомедицине несет с собой огромное количество новых данных, касающихся как геномов, так и новых химических компонентов, которые являются производными этих средств, свойства и потенциал которых могут быть рассмотрены и как новые лекарства. Более чем 1 млн. таких компонентов ежегодно изучается только в США, но многие впоследствии исключаются из применения из-за их токсических свойств. Развитие в этой области имеет быстрый прогресс также и в связи с тем, что время на разработку лекарств должно постоянно снижаться, поэтому были разработаны новые информационные системы, названные Матрицей лекарств (Drug Matrix).Эта система содержит тысячи ссылок на лекарства и модели их новых эффектов.

Этапы создания инновационных лекарств

Жизнь подсказывает потребности в инновационных препаратах, например, когда речь идет о борьбе со смертельными болезнями, а существующие средства уже бессильны, или в ситуациях, связанных с обеспечением безопасности людей в экстремальных состояниях и ситуациях. Новые, аксиоматично более безопасные препараты, могут улучшить качество и защиту жизни людей [10]. Путь от фундаментальной разработки лекарства или протектора вплоть до выхода их в медицинскую практику оценивается в 1,5 млрд. долл. и складывается из шести основных этапов.




Первый этап – *замысел,* длительность этого этапа подсчитать невозможно.

Второй этап – *лабораторное воплощение* концепции, предусматривающей идентификацию, выделение или синтез потенциального вещества; на это уходит от 3 до 5 лет.

Третий этап – *доклинические исследования* нескольких сотен или тысяч веществ, выделение лидирующего компонента с последующим определением его эффектов и тестированием в лаборатории *in vitro* и *in vivo* в соответствии со стандартами GLP.

Четвертый, наиболее ответственный этап – *клинические исследования*, включающие три фазы. *Первая фаза* первого испытания на людях, в которой участвуют от 10 до 100 здоровых и крайне редко больных людей, направлена на определение фармакокинетики и фармакодинамики нового препарата, а также на выявление побочных эффектов, возникающих при увеличении дозировки препарата. *Вторая фаза* клинических испытаний, проходящая при участии 100-300 пациентов, существует для того, чтобы получить данные для сравнения с плацебо или активным препаратом. В этой фазе изучают эффективность препарата по конкретным показаниям у небольшого количества больных и определяют наличие краткосрочных побочных эффектов. *Третья фаза* терапевтических испытаний, в которой задействовано 1000-3000 пациентов, направлена на то, чтобы получить дополнительные данные об эффективности и безопасности препарата, необходимые для оценки преимуществ и риска, связанных с его приемом. Регистрируются нежелательные побочные реакции (НПР) с частотой более 1%. Все три фазы выполняются по стандартам GCP.

NB! По статистике, только три из десяти препаратов окупают расходы на их клиническую оценку. Около 1% препаратов допускают до клинического тестирования и лишь только одной молекуле из тысяч суждено обрести форму нового препарата и стать открытием.

Создав новый препарат и получив патент, то есть юридически оформив права, защищающие новую разработку на определенный срок от создания копий и воспроизводства данного препарата, разработчик имеет относительный «иммунитет» и приоритет на уникальность препарата на данный момент времени.

Пятый и шестой этапы – государственная *экспертиза и регистрация* лекарственного средства, *производство и рынок*. Регистрация нового препарата приближает его к пациенту. В Европе документация, необходимая для подачи заявки на регистрацию препарата, состоит из тысяч папок, содержащих иногда сотни тысяч страниц. Если их сложить стопкой, то получится колонна высотой не менее 100 метров, а если разложить папки одна за другой, то их протяженность составит более 500 метров. А вслед за этим необходима отработка промышленной технологии, выпуск по требованиям GMP, лицензирование, проведение на рынок. В этом случае действуют стандарты GPP и GDP. На всех этапах есть свои «подводные камни». Но этим контроль за лекарственными средствами не завершается. В *четвертой фазе* проводятся постмаркетинговые наблюдения и фармакогенетический контроль.

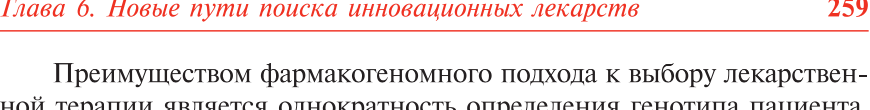
Через унитропность рецепторов к спектру эффектов

Представления о рецепторных механизмах регуляции жизнедеятельности организма и воздействии на них лекарств, ксенобиотиков и разнообразных биологически активных веществ претерпевают в начале XXI века некую трансформацию [10]. Открытия все новых рецепторов подобны перенасыщенному раствору, неизменно переходящему в стадию рекристаллизации. Анализ существующих представлений о фармако- и токсикодинамике веществ, механизмах их действия логично аппроксимируется в синтез и консолидацию новых представлений фармакогеномики и фармакопротеомики (рис. 6.1).

Фармакогеномика – это развитие постгеномных технологий в фармакологии, изучение распространенности генетического межвидового и внутривидового полиморфизма, генотипирования ферментов метаболизма лекарств и иных процессов, объясняющих индивидуальные различия эффектов лекарственного лечения [2, 8].

Различие фармакогенетики от фармакогеномики заключается в том, что первая изучает общие особенности генетической детерминированности действия лекарств, а вторая – их эффекты у индивидуумов.

NB! Будущее фармакогеномики – в использовании в клинической практике молекулярных методов, ориентированных на индивидуальный подбор лекарственного препарата и его дозы для пациента.



Преимуществом фармакогеномного подхода к выбору лекарственной терапии является однократность определения генотипа пациента. Генотип не изменяется в течение всей жизни, если не считать редких соматических мутаций. Методы генотипирования совершенствуются столь быстро, что скоро будет возможным тестирование тысяч нуклеотидных замен в одном анализе [9]. Тестирование на введение лекарственного вещества, например, по 20000 однонуклеотидным полиморфизмам в 5000 генах, возможно уже в недалеком будущем. Генотипирование возможно интерпретировать в соответствии с диагнозом и корректно использовать для выбора фармакотерапии.

На каждом этапе развития науки возникают новые и совершенно «неожиданные» концепции и взгляды, которые при более внимательном рассмотрении выглядят как хорошо забытые старые.

Молекулярная *белковая машина* взаимосвязана с информационной структурой *гена*. Белковые «карты» биосистем организма, анализ экспрессии генома на уровне мРНК, геномный анализ клеточных популяций и продолжающаяся «инвентаризация» тканевых белков создали предпосылки нового научного направления – *протеомики* [4]. Это новый, следующий за геномикой, этап развития биомедицинских технологий (рис. 6.1).





Структура GPCR. Большое и широкое семейство генов в царстве грибов, растений и животных, обеспечившее появление GPCR (*G-protein coupled receptors*), привело к делению общей структуры на 7 трансмембранных сегментов с минимальной последовательностью подобия наиболее удаленным GPCR. В то же время, семейство белков GPCR в геноме человека более чем представительно (около 900 членов), а рецепторы и лиганды играют роль во многих аспектах физиологии, фармакологии и имеют отношение к большому числу заболеваний (в ряду примерно 200 GPCR) через изучение его роли в геноме, лиганде, рецепторе. Примерно 1700 GPCR и несвязанных мембранных протеинов в качестве контроля разделены на 34 кластера. Этот подход позволил идентифицировать в системе GPCR рецепторы для аминов, пуринов, пептидов, VIP, секретинов, цАМФ, мелатонина, серотонина, родопсина, ГАМК, глюкозы и т.д. Но, что для нас наиболее интересно – это идентификация рецепторов для пиримидинов [5, 7, 23].

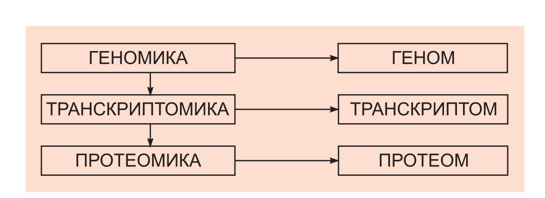


Рис. 6.1. На основе изучения генополиморфизма возникли три уровня аналитических подходов (*ген-РНК-белок*) на путях от геномики к протеомике

Теория биохимических трансформаций Нидхэма приводит к выводу о существовании «общего химического плана», свойственного всем организмам, и о возможности преобразовать одну биохимическую систему в другую с помощью определенных пространственно-временных трансформаций. Исследования семейства генов в мире грибов, растений и животных, привели к открытию *серпантинных белков* [30].

NB! Внешняя часть каждого витка серпантина является антенной для молекулярных сигналов, входящих в клетку, а внутренние части – триггером на отклик клетки на эти сигналы, начиная с активации сигнального процессора, называемого G-протеин (G-protein). Сами серпантины, таким образом, известны как G-протеин, связанный с рецепторами (G-protein coupled receptors или GPCR).

Все GPCR рецепторы обладают сходной структурой. Каждый из них представляет собой интегральный белок, который имеет наружную или внеклеточную, внутреннюю или внутриклеточную части и семь трансмембранных доменов (рис. 6.2). Гены, кодирующие эти белки, состоят из двух *экзонов* и одного *интрона,* разделяющего кодирующую последовательность на участке, соответствующем второй внутриклеточной петле белка. Было установлено, что при экспрессии генов GPCR-рецепторов имеет место *альтернативный сплайсинг*, благодаря чему образуется несколько транскриптов этих генов.




Бурное развитие исследований трансмембранных белков GPCR, мембранных белков, ионных каналов, поринов, транспортеров и т.д. заставило оглянуться и вспомнить представления о явлениях *унитропизма* лекарств и ксенобиотиков [5].

В 1993 году в книге «Психоунитропизм лекарственных средств» [7] мы дали определение унитропизму (uni – единый, tropos – направление, сродство) как явлению дозозависимого, однонаправленного системного действия лекарств (см. гл. 5). Эта концепция стала более приемлемой и понимаемой после того, как в середине 90-х гг. XX века были установлены уникальные свойства серпантинных (serpentine) белков клеточных мембран, с которыми, наряду со специфическими рецепторами, взаимодействует огромное количество лекарств, по меньшей мере, половина из известных сейчас (рис. 6.2).

Трансмембранные белки представляют собой одну из самых больших групп белков, выполняющих сигнальную, транспортную, защитную, рецепторную, метаболическую и структурную функции. Похожесть рецепторов, находящихся на поверхности клетки, выдвинула предложение новых целей, которые являются результатом разработки новых лекарств для лечения самых различных заболеваний. На молекулярном уровне эти лекарства воздействуют на один серпантинный

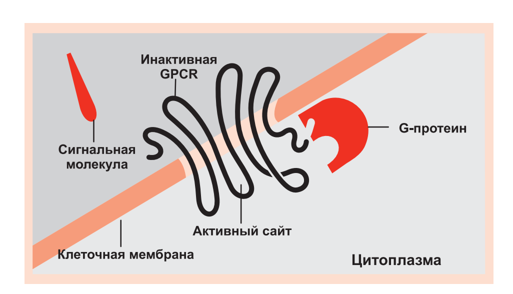
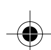


Рис. 6.2. GPCR семь раз пересекает клеточную мембрану, что является типичным результатом блокировки сообщения в клетку, пока сигнальная молекула (гормон, нейромедиатор и т.д.) не обволакивает область, называемую активной зоной (сайтом)



Рис. 6.3. Лиганд-рецепторное «обволакивание» является причиной активации молекулы, называемой G-протеином, которая переключает серию внутримолекулярных взаимодействий. Кульминацией же является изменение поведения клетки




белок, который семь раз проходит через мембрану, клетки.

Новые взгляды на функционирование GPCR предполагают появление новых подходов к лечению болезней. Трансмембранные белки представляют собой одну из самых больших групп белков, выполняющих сигнальную, транспортную, защитную, рецепторную, метаболическую и структурную функции (рис. 6.3).

Эффекты GPCR. Несмотря на универсальность структуры GPCR унитропностью к ним обладает великое множество существующих и, надо думать, будущих лекарств. В таблице 6.1 приводятся различные лекарства, которые воздействуют на эти рецепторы, понижают давление, снижают выделение кислоты в желудке, бронходилятаторы, антидепрессанты и др. Следует подчеркнуть, что каждый из названных здесь препаратов обладает и другими свойствами, например, производные пиримидинов утеплекс и метилурацил, наряду с репаративными свойствами, обладают психотропными эффектами [7].

Многосторонность системы GPCR значительно превосходит любой другой класс поверхностно-клеточных рецепторов. Природные молекулы, на которые есть отклик GPCR, имеют размер от нейротрансмиттеров, которые только в несколько раз больше атома углерода, до протеинов, которые в 75 раз больше него. GPCR участвует во всех функциях организма, которые поддерживают жизнь: от биения сердца и пищеварения до дыхания и активности мозга.

Проведение сигнала. Наиболее хорошо изученными рецепторами системы GPCR оказались аденозиновые рецепторы A_1 и A_2. Первоначально их классифицировали на основе воздействия на аденилилцик-

Таблица 6.1

Примеры разнообразия лекарств, действующих на GPCR-систему

Препараты	Показания
Albuterol	Бронхо-легочные заболевания
Cetirizine	Спастические симптомы
Famotidine	Язвенная болезнь
Fentanyl	Нейролептаналгезия
Fexofenadine	Антиаллергическое средство
Methyluracil	Регенерация и лейкопоэз
Metoprolol	Гипертоническая болезнь
Montelukast	Воспаления бронхо-легочной системы
Olanzapine	Антипсихотическое средство
Oxycodone	Обезболивающее средство
Parokcetin	Антидепрессант
Pomethazine	Антигистаминный препарат
Pseudoephedrine	Кровоостанавливающее средство
Ranitidine	Гиперацидный гастрит, язвы ЖКТ
Salmeterol	Антиастматическое средство
Sumatriptan	Лечение мигрени
Tamsulosin	Простатит и опухоли простаты
Uteplex (уридин)	Противоязвенное средство




лазу. Рецептор A_1 является ее ингибитором, а рецепторы A_2 — стимуляторами. В действительности, рецепторы A_1 и A_2 взаимодействуют с различными G-белками: рецептор A_1 — с $G_{i/o}$-белком, а рецептор A_2 — с G_s-белком. Рецептор A_3 также взаимодействует с $G_{i/o}$-белком. Кроме того, имеются данные, что все аденозиновые рецепторы могут взаимодействовать и с другими G-белками [13, 17, 26, 30].

После активации G-белков активируются определенные ферменты и ионные каналы. С участием рецептора A_1 осуществляется ингибирование аденилил циклазы, активация некоторых типов калиевых каналов, инактивация N-, P- и Q-типов кальциевых каналов, активация фосфолипазы Cβ и т.п. Сходным образом действует и рецептор A_3. Рецепторы A_{2A} и A_{2B} стимулируют образование цАМФ, но другая их активность, в частности мобилизация внутриклеточного кальция, также была описана. Воздействие рецептора A_{2A} на нейтрофильные лейкоциты отчасти обусловлено цАМФ, но цАМФ-независимые эффекты, связанные с активностью рецепторов A_{2A}, также можно предположить.

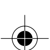
По нашему мнению, образование пакетов гладких мембран в цитоплазме, последующая дислокация их к поверхности клетки и даль-



нейшее встраивание молекул фосфолипидов в плазмолемму и составляют основу восстановительного процесса, осуществляемого с помощью субповерхностных цистерн [7]

При инкубации срезов сначала с антителами против лиганда (гликопротеид с терминальной галактозой), а затем с антителами против соответствующего рецептора идентифицирована везикулярно-тубулярная система, получившая название CURL (*от англ.* compartment of uncoupling of receptor and ligands, то есть место разделения рецептора и лиганда). В ней происходит диссоциация рецептора и лиганда, а также их перераспределение, в результате чего лиганды сосредотачиваются в везикулярной части CURL, а рецепторы — в тубулярной ее части [5, 7].

Агонисты и антагонисты GPCR





Лекарства, воздействующие на GPCR, работают либо как классические агонисты, то есть воздействуют на область «антенны» в рецепторе (также известную как *активная область*) и имитируют эффект природного нейротрансмиттера, гормона или другой молекулы, которая обычно посылает сигналы через GPCR (рис. 6.4), либо как антагонисты то есть служат помехой способности самого организма воздействовать на антенну (рис. 6.5).

NB! За последние 15 лет технологическая революция предоставила исследователям с новым мышлением возможность увидеть GPCR в работе. Последовательно появились другие способы манипулирования активностью GPCR и разработки новых лекарств.



Рис. 6.4. Стандартные лекарства и ксенобиотики атакуют активную область некоторых рецепторов на поверхности клетки и множество целей для активизации области специфической GPCR (внизу)

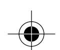
Несмотря на богатство медицинских средств, предполагается много открытий и интересных вещей впереди. Исследование принципиально новых фармацевтических средств находится на ранних стадиях, но некоторые агенты, включая средства лечения опухолей и ВИЧ-инфекций, уже в настоящее время развиваются через испытания на человеке [30, 37].



Рис. 6.5. Если молекулы действуют вне клетки, активная зона может также влиять на активность GPCR. Препараты, которые действуют на GPCR, обычно воздействуют на активную зону и или имитируют действие природной сигнальной молекулы (см. рис. 6.4), или препятствуют природным сигналам вследствие блока рецептора, и, таким образом, их воздействию на клетку

Выявлено много химических соединений, которые являются агонистами и антагонистами GPCR (рис. 6.4 и 6.5). Для аденозинового рецептора A_1 у человека, крысы и мыши в качестве основного синтетического агониста выступает N^6-циклопентиладенозин (CPA) и его производные, а в качестве антагониста – 1,3-дипринил-8-циклопентилксантин (DPCPX).

Другой интересный класс соединений, взаимодействующих с рецептором A_1, представляет собой так называемые *аллостерические энхансеры* [18]. Вещества этого класса повышают способность агонистов связываться с рецепторами и усиливают эффект от их действия. К числу этих соединений относится (2-амино-4,5-диметил-3-тиенил)-[3-(трифлуорометил)-фенил]-метанон (PD81723) и его производные [13].



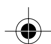

В качестве селективного агониста рецептора A_2 долгое время рассматривалось вещество 5′-N-этилкарбоксамидаденозин (NECA), но за последнее время было получено производное этого вещества, обладающее большей селективностью – 2-[p-(2-карбонил-этил)-фенилэтиламино]-5‘-N-этилкарбоксамидаденозин (CGS21680). Однако у человека это вещество действует на рецептор A_2 менее эффективно и менее избирательно, чем у крысы. Дополнительная проблема, связанная с CGS21680 как с инструментом для скрининга, заключается в том, что это вещество имеет свойство связываться с другими рецепторами, никак не связанными с рецепторами аденозина [11].

Недавно был получен новый агонист рецептора A_{2A}, который более чем в 50 раз превосходит CGS21680 по эффективности – 4-{3-[6-амино-9-(5-этилкарбамоил-3,4-дигидрокси-тетрагидрофуран-2-ил)–9Н-пурин-2-ил]-пропо-2-инил}-метиловый эфир циклогексанкарбоксиловой кислоты (ATL146e) [22]. Рецептор A_{2A} также имеет несколько антагонистов, среди которых наиболее важные 5-амино-2-(2-фурил)-7-фенилэтил-пиразоло[4,3-e]-1,2,3-тразоло[1,5-c]пиримидин (SCH58261) и 4-(2-[7-амино-2[2-фурил]-[1,2,4]триазоло[2,3-a]{1,3,5}тразин-5-ил-амино]этил)фенол(ZM241385) [14, 23, 27].

Аденозиновый рецептор A_{2B} обладает низким сродством к большинству агонистов, и селективность этих агонистов также незначительна. В случае *антагонистов* дело обстоит лучше – обнаружены эффективные и относительно избирательные антагонисты (рис. 6.5).

Открытый самым последним, аденозиновый рецептор A_3 является нечувствительным к некоторым ксантинам, поэтому антагонисты этого рецептора обладают нексантиновой структурой, включая дигидропиридины, пиридины и флаваноиды [14]. Изохинолин и хинозолин производные образуют другой класс высокоспецифичных антагонистов рецептора A_3 человека. VUF8504 (4-метокси-N-[2-(2-пиридинил)хинозолин-4-ил]бензамид) был первым представителем этого класса. Позднее был открыт VUF5574 (N-(2-метоксифенил)-N-(2-(3-пиридил)хинозолин-4-ил)мочевина) – вещество более эффективное, чем VUF8504. Одним из наиболее *селективных антагонистов* рецептора A_3 человека является MRE-3008-F20-5–[[(4-метоксифенил)амино]карбонил]амино-8-этил-2-(2-фурил)-пиразоло[4,3-е]1,2,4-триазоло[1,5-с]пиримидин [23, 30].

Межвидовые лиганд-рецепторные различия




Клинико-генетические наблюдения различий лекарственного воздействия впервые опубликованы в 1950-х годах. Они дали толчок развитию фармакогенетики, а позднее фармакогеномики. Еще раз подчеркнем, что фармакогенетика изучает общие особенности генетической детерминированности действия лекарств, а фармакогеномика объясняет индивидуальные различия эффекта лекарственного лечения. Индивидуальные особенности человека и животных определяются вариабельностью нуклеотидных последовательностей, например SNP **G** и SNP **A** (рис. 6.6).

Межвидовые различия в сродстве лигандов наиболее значительны ввиду вариабельности лигандов рецептора A_3. Как правило, сродство одних и тех же антагонистов к рецепторам A_3 *человека* примерно в 100 раз выше, чем к рецепторам *крысы*. Были обнаружены также *межвидовые различия* в сродстве лигандов к своим рецепторам. В особенности это относится к антагонистам. Так например, 8-фенилксантины избирательны в отношении рецепторов A_1 у крысы и менее избирательны у человека [25]. Это снижение избирательности связано с тем, что у человека 8-фенилксантины обладают сродством не только к A_1, но и к A_{2A} рецепторам [11].

Фармакологическая роль рецепторов системы GPCR изучалась на биомоделях – генетически модифицированных *нокаутных мышах* [6].

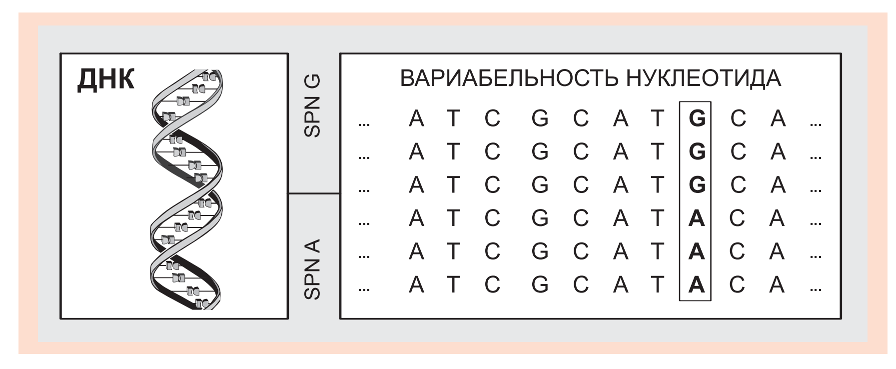
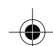


Рис 6.6. Идентификация SNPs для различных популяций, связанных с вариабельностью нуклеотидных последовательностей

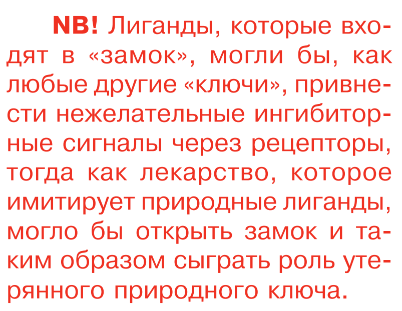
Первым геном, подвергнутым нокауту, был ген рецептора A_{2A}. Изучение таких мышей показало, что рецептор A_{2A} играет роль в проведении болевого сигнала через периферические участки, ингибировании агрегации тромбоцитов и регуляции кровяного давления. Рецептор A_{2A} также важен для моторной стимуляции эффектов кофеина. Также было показано, что рецептор A_{2A} вносит свой вклад в ишемические повреждения мозга у взрослых мышей [13, 21].




Мыши с инактивацией рецепторов A_3 у мышей показали снижение влияния аналогов аденозина на дегрануляцию тучных клеток [22], что вызывало снижение проницаемости сосудов. Эти животные продемонстрировали неожиданное увеличение кардиоваскулярных эффектов при введении им аденозина [37].

Инактивирование рецепторов A_1 вызвало повышенное *чувство тревоги*, кроме того, эти мыши становились гипераллергиками. Показано участие рецептора A_1 в проведении сигнала *эндогенной антиноцицепции*. У этих животных влияние аденозина на возбудительную нейротрансмиссию было полностью элиминировано [24, 26, 27], а нейрональный ответ на гипоксию был также значительно изменен. Кроме того, у этих животных отсутствовала тубулогломерулярная петля обратной связи и был повышен уровень ренина [17]. Интересно, что все эти животные имели нормальную жизнеспособность и фертильность [6, 14, 17].

До последних лет преобладало мнение, что для влияния на активность GPCR лекарства должны воздействовать на активную область рецепторов, поскольку при нормальном функционировании организма нейротрансмиттеры и другие информационные молекулы-лиганды играют роль «ключа» для «запирания» на внешней поверхности активной области (рис. 6.7).


NB! Лиганды, которые входят в «замок», могли бы, как любые другие «ключи», привнести нежелательные ингибиторные сигналы через рецепторы, тогда как лекарство, которое имитирует природные лиганды, могло бы открыть замок и таким образом сыграть роль утерянного природного ключа.

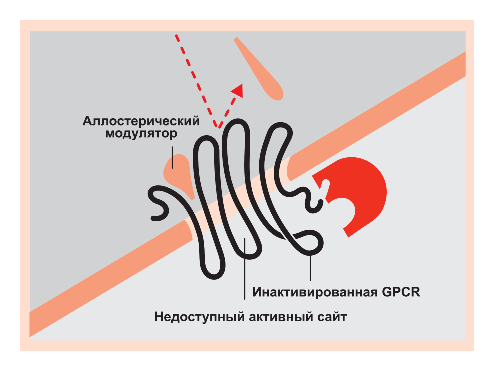
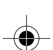


Рис. 6.7. Аллостерические модуляторы модифицируют действие фармакологических агентов и стабилизируют согласование GPCR на пути, который увеличивает или уменьшает активность рецепторов, обеспечивающих недоступность активной области для подачи сигнала молекуле

Вызвать селективный физиологический отклик могли бы вещества, которые способны взаимодействовать со специфической формой рецепторов, но игнорировать другие варианты. Нейротрансмиттеры норадреналин и адреналин, например, активизируют два вида GPCR, называемых α- и β-адреноцепторы, из которых первый имеет четыре подтипа (α_1-α_4), а второй – три (β_1-β_3). Эти различные рецепторы, при возврате, руководят различными процессами поддержания жизни. В сердце β_1- адреноцептор учащает сердцебиение и увеличивает силу в каждой доле; в легких β_2-адреноцептор расширяет воздушные каналы. Следовательно, для открывания сократившихся воздушных путей без нежелательных побочных эффектов на сердце фармакологи могут создать агент, который имитирует способность адреналина стимулировать β_2-адреноцептор. но без эффекта стимулирования β_1-адреноцептора.




NB! Лекарства работают как ингибиторы или агонисты, моделируя имитаторы взаимодействия с активной областью специфической GPCR. Новая стратегия развития лекарств будет иметь дело с «аллостерической» природой GPCR, то есть форма одной части рецептора может влиять на согласованность и таким образом на активность удаленных частей единой рецепторной системы.

Действительно, конформационные способности позволяют GPCR постоянно адаптировать различные ее формы, существенно сопоставляя с «блоком памяти». В этом случае естественные сигнальные молекулы воздействуют на активную область и активируют G-протеины. В дальнейшем, по принципу обратной связи, активные молекулы, известные как *аллостерические модуляторы*, могут переплетаться в другом месте для влияния на его форму и активность (рис. 6.7). «Стабилизированные» GPCR повышают способность передавать сигналы, тогда как

«коррегирующие» формы, которые пряча подобно разведчикам-нелегалам активную область так, чтобы она стала недоступной для этих природных лигандов, препятствуют этому.

NB! Существуют большие перспективы терапевтической модификации функции GPCR. Теоретически рецепторы могут влиять на оплетенные области в любом случае, когда маленькая молекула может стабилизировать форму, которая является результатом добротного биологического эффекта.

Активно исследуются потенциальные *аллостерические модуляторы*, которые способны блокировать ВИЧ-возбудители из инфицированных клеток [35]. Вирусы атакуют клетки Т-хелперы путем прилипания к поверхности белка, называемого CD4. Этот белок никогда не действует в одиночку. Для попадания в клетку вирус оплетает дополнительный якорь GPCR, известный как CCR5 или, на более поздних стадиях инфицирования, называемый CXCR4. Обычно CCR5 откликается на любой из трех хемокинов, природные сигналы которых могут притягивать клетки иммунной системы к области инфекции, но к несчастью для ВИЧ-инфицированных пациентов этот якорь является мощным крючком для протеина, покрывающего вирус (gp120). Но нет худа без добра, ибо CCR5 теперь появляется на научном поле, чтобы быть центральным игроком в расшифровке ВИЧ-инфекции и птичьего гриппа H_5N_1.



Становится понятным, что апокалипсические прогнозы некоторых ученых, предрекающих гибель человечества от СПИДа или вируса H_5N_1, к счастью, не оправдываются, а снижение смертности предопределено возрастанием числа людей, которые генетически маскируют «якоря» CCR5 и CXCR4, создавая предпосылки причин для их недостатка в функциональных формах GPCR в отношении вирусных белков gp120 и других. *Аллостерические модуляторы*, которые поддерживают CCR5 в формах неблагоприятных к оплетанию gp120 из ВИЧ, уже изучаются на людях. Блокировка взаимодействия gp120–CCR5 путем доставки этих крошечных лекарств является достижением, сравнимым с подвигом Давида, победившего Голиафа.

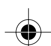
Дуальность и унитропность системы GPCR

Эффект, производимый GPCR, зависит не только от внеклеточных молекул, которые оплетают их, но также от того, сколько копий рецепторов доступно на поверхности клетки. Можно было бы ожидать, что когда внеклеточные сигналы переплетают многие копии рецепторов, клетка получает более «громкое» сообщение и подвергается большим поведенческим изменениям, чем в случае, когда включено только не-

сколько единичных копий рецепторов. Но возрастание количества активных рецепторов может сделать больше, чем просто осуществление контроля их «объемов». Оно может действительно влиять на некоторые виды G-протеинов, стимулировать их и таким образом «руководить» активацией различных каскадов молекулярных взаимодействий внутри клетки, обеспечивая процессы *унитропности* к лигандам.

NB! GPCR может более не рассматриваться как простой тумблер или «+»/«–»-переключатель на гормональном или нейротрансмиттерном уровне или как выключатель, когда природный сигнал уходит из оплетенной области. Он является гораздо более сложной информационно-процессорной единицей механизмов унитропизма.

G-протеины приходят в четырех главных формах, с подтипами в каждом классе. Каждый имеет свою склонность к работе с любым заданным GPCR и для его части GPCR может не быть равной активности суммы всех G-протеинов. Скудный запас данных рецепторов может быть, таким образом, результатом активации только наиболее чувствительного G-протеина, тогда как изобилие может руководить откликом множества G-протеинов, создающих различное клеточное поведение.





Теоретически, различные варианты откликов, которые данные GPCR могут генерировать, будут зависеть как от ряда лигандов, которые можно определить, так и от смеси видов G-протеинов, которые можно активировать. Как пример можно привести отклик GPCR на тиротропин, гормон гипофиза, который вырабатывается щитовидной железой. Если, например, рецептор может определить любые три различных сигнала и может активировать любой из них, или даже все четыре главных G-протеина, то такой рецептор выигрывает теоретическую способность запуска десятков форм поведения в тот или иной момент времени. Если бы это был только двухполюсный переключатель, он имел бы только два положения для включения или выключения лишь одной формы реакции.

Разные субстанции могут активировать рецепторы для поддержания различных биологически активных форм, каждая из которых может взаимодействовать с различными G-протеинами или комбинациями G-протеинов, переключая активность расходящихся внутриклеточных путей и создавая каскадность реакций в клетках (рис. 6.8).

NB! Агенты, которые могут вызывать увеличение или уменьшение количества рецепторов на поверхности клетки, должны быть признаны наиболее ценными в формировании механизмов *унитропизма*, а принципиально новые лекарства обладать преимуществами этой комплексности в воздействии на рецепторы.

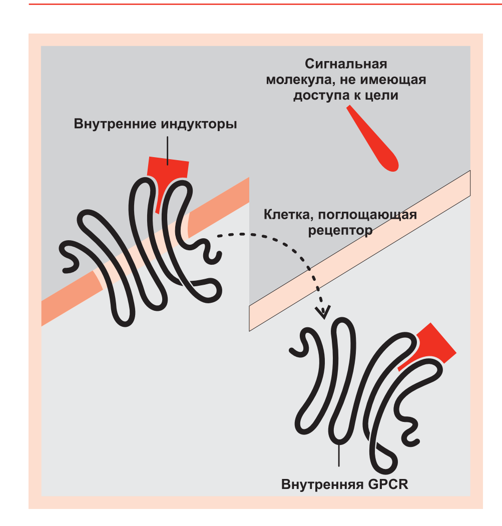
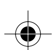


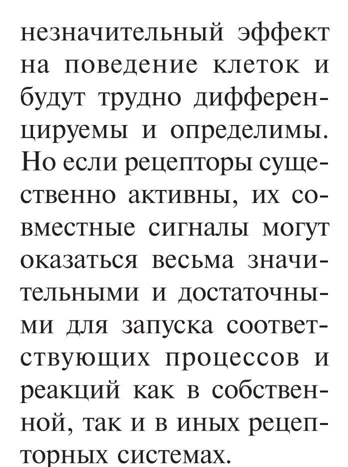
Рис. 6.8. Целью внутренних индукторов и инверсных агонистов является «конституционная» активизация GPCR. Такие рецепторы имеют «неправильное» поведение, как если они направляются стимуляторами, даже когда их нет (слева). Прикрепление инверсного агониста приводит к переводу GPCR в «спокойное» состояние (справа)




Эта последняя стратегия могла бы преследовать цель поражения ВИЧ. Однако трудность, которая возникает вследствие действия аллостерических модуляторов, заключается в том, что вирус быстро мутирует. Проблема возникает из-за повреждения вирусного покрытия белка и включенных в него областей на CCR5 (рис. 6.8). Способность к мутации может привести к созданию покрытия белка, которое становится близким «родственником» к аллостерически ранним CCR5. Благовидным предлогом для предотвращения этой угрозы должна быть блокада механизмов унитропизма и изгнание «блудного сына» рецептора с поверхности клетки, и устранение таким образом точки вирусной атаки.

Подобно всем другим GPCR, CCR5 синтезируется бесконечно клеткой, расположенной на поверхности, и затем входит внутрь для деградации или переработки, а окончательный хемокинез обеспечивает CCR5 интернализацию. Этот путь повышает возможность нахождения фармакологических агентов, которые не только должны ускорять перемещение CCR5 с поверхности клетки, но также выступать в качестве протектора, к которому вирус не сможет адаптироваться. После всего этого возбудитель ВИЧ лишается возможности блокады входа в CCR5 с поверхности клетки.

GPCR, будучи за пределами контроля аллостерических модуляторов, может представить другое биологически важное поведение, известное как основная деятельность (constitutive activity). Суть его в том, что они могут активировать G-протеины даже без вовлечения пограничных лигандов (рис. 6.9). Действительно, в других изоформах функционирование GPCR превращается из существующей формы в вид, характерный для рецепторов. Их структура, однако, при этом такая, какую рецепторы принимают крайне редко. При нормальных условиях количества молекул, которые адаптируются, будет мало и они будут оказывать

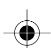


незначительный эффект на поведение клеток и будут трудно дифференцируемы и определимы. Но если рецепторы существенно активны, их совместные сигналы могут оказаться весьма значительными и достаточными для запуска соответствующих процессов и реакций как в собственной, так и в иных рецепторных системах.



Рис. 6.9. Генетически модифицированные факторы негативных воздействий, как и раковые клетки, являются инверсными агонистами и зачастую имеют большое число конституционально активных рецепторов, которые теоретически могли бы привести к бесконтрольному делению клетки

GPCR-система может осуществлять свою функцию во взаимодействии с многими рецепторными системами. Получен ряд доказательств, свидетельствующих о важных взаимодействиях между аденозиновыми рецепторами A_1, рецепторами дофамина D_1 и N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторами в мозгу [16, 32, 33].



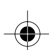

Во-первых, активация NMDA-рецепторов способна увеличивать высвобождение аденозина. Во-вторых, известно, что аденозин может снижать высвобождение глутамата путем активации пресинаптических рецепторов и посредством этого уменьшать активность NMDA-рецепторов. Вдобавок активация аденозинового рецептора A_1 уменьшает поступление NMDA путем постсинаптического действия [32, 33]. В-третьих, NMDA-рецепторы и рецепторы дофамина D_1 синергитически оказывают влияние на экспрессию ранних генов в мозгу [16, 33], а некоторые долгосрочные эффекты от активации дофаминовых рецепторов D_1 могут быть блокированы NMDA-рецепторами по механизму антагонизма. Но существует и антагонистическое взаимодействие между дофаминовыми рецепторами D_1 и аденозиновыми рецепторами A_1. Все эти взаимодействия функционально взаимосвязаны, и активация дофаминовых рецепторов D_1 уменьшает высвобождение глутамата путем стимуляции активности NMDA-рецепторов. Это приводит к высвобождению аденозина, который в свою очередь взаимодействует с пресинаптическими рецепторами A_1.

Аденозиновые рецепторы A_{2A} в большом количестве содержатся в базальных ганглиях некоторых видов, включая человека. Там они преимущественно сконцентрированы в ГАМК-ергических выводных нейронах. Эти нейроны также экспрессируют дофаминовые рецепторы D_2, и было показано, что эти два типа рецепторов взаимодействуют

между собой [19, 20, 28]. Было установлено, что главная роль дофамина в клетках стриатума заключается в подавлении проведения сигнала через рецепторы A_{2A} [19].

Аденозиновые рецепторы A_{2B} представлены во многих клетках, и было неоднократно показано, что проведение сигнала через эти рецепторы связано с проведением сигнала через другие рецепторы, воздействующие на PLC-Ca^{2+}-протеинкиназы С, и эта связь осуществляется по типу конкурирования [11, 12]. Существует также множество других примеров взаимодействия между GPCR и рецепторами других классов.

NB! Синергизм/антагонизм присущ GPCR не только в отношении дофаминовой системы. Этот, внутренне противоречивый, но вполне логичный входной билет в будущее, выдан нам матушкой-Природой, причем на одной его стороне написано «унитропность», а на другой – «дуальность».





Дуальность фундаментальных природных процессов хорошо отображается в деятельности системы GPCR. Так, наряду с осуществлением *жизненно важных механизмов*, через GPCR могут запускаться и *патологические процессы*. Это особенно наглядно при таких болезнях, как вирусная инфекция или рак, которые могут преимущественно индуцировать один или несколько рецепторов-триггеров болезни. Например, через рецептор для гормона, называемого вазоактивным интестинальным пептидом (VIP), может запускаться рак поджелудочной железы. В нормальной панкреатидной клетке, которую отображает этот GPCR, активация рецептора VIP'ом приводит к делению клеток, но у человека, больного раком, рецептор становится избыточным и производит это действие бесконечно, без необходимости для VIP-стимуляции (рис. 6.9). Возникают предпосылки для мощной пролиферации клеток опухоли. Онкологи наблюдали подобные явления разрушающей деятельности в определенных не-GPCR-рецепторах, называемых расами.

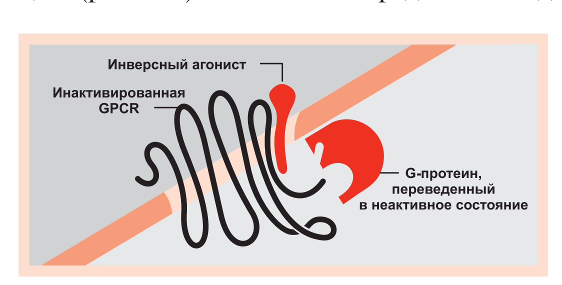


Рис. 6.10. Позитивным моментом является то, что инверсные агонисты могли бы потенциально стать новой стратегией создания средств для лечения рака и антагонистами (антидотами) воздействий трансгенных возбудителей и токсинов

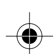
Существующие противоопухолевые средства не способны подавить клеточные механизмы инвертированного переключения конституцио-

нально активных рецепторов (рис. 6.10). Агонисты рецептора должны были бы «подсказать» рецепторам, как поддерживать активную форму, антагонисты должны были бы предупредить природный сигнал из активного рецептора, однако, такие агенты не действуют на рецепторы, которым не требуются внешние воздействия для развития эффекта.

NB! В будущем потребуются принципиально новые лекарства, которые воздействуют на структуру активной GPCR для поддержания ее *неактивной формы*, пребывающей в ждущем режиме.

Такие агенты, называемые ***инверсными агонистами***, помогут создать новую важную стратегию противораковой терапии (рис. 6.10). Они также могут применяться при лечении ожирения. В этой области можно предвидеть цели, включая новые типы рецепторов, например подтипа H_3 рецептора гистамина, в качестве регулятора аппетита через мозговые регуляторные системы.

Фармакопротеомика – целеуказание для новых лекарств




Поиск биологических моделей на основе белковых веществ и конструкций для понимания механизмов действия и развития многогранных эффектов лекарств ведется давно. Но лишь к XXI веку эти исследования оформились в виде биомедицинского научного направления, получившего название *фармакопротеомика*. Фармакопротеомика возникла на стыке геномики, протеомики и фармакологии.

Белок, как правило, выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в отдельных случаях – несколько взаимосвязанных. На рис. 6.11 показана в самом общем виде сфера неполного множества белков, с которыми с различной степенью заинтересованности взаимодействуют лекарства и ксенобиотики. Эта сфера столь обширна, что, мы уже говорили, понадобилось выделить ее в самостоятельное научное направление – *фармакопротеомику*.



Рис. 6.11. Лекарства, протекторы и ксенобиотики взаимодействуют со всем разнообразием белковых молекул

NB! Протеомика является дальнейшим развитием постгеномных технологий, а ее название возникло от сложения двух терминов: «PROTEins» и «genOMe».

Фармакопротеомика является научным направлением исследования новых потенциальных биомишеней лекарств, изучения интимных механизмов их действия, включая лиганд-рецепторные отношения, конструирования и оценки эффектов от новых веществ к инновационным лекарствам.

Фармакопротеомика неразрывно связана с фармакогеномикой, как продуктивно и взаимооплодотворяюще развивающиеся области инновационной фармакологии. В качестве примера системного биомоделирования можно привести последние данные о том, как четыре аденозиновых рецептора из подмножества GPCR были клонированы и охарактеризованы у различных видов млекопитающих. Эти рецепторы получили название A_1, A_{2A}, A_{2B} и A_3 в соответствии с принципами номенклатуры рецепторов, принятой NC-IUPHAR. Согласно рекомендации NC-IUPHAR название рецептору дается по названию главного эндогенного агониста. Рецепторы A_{2A} и A_{2B} взаимодействуют главным образом с G_s-белком, а рецепторы A_1 и A_3 с $G_{i/o}$-белком, однако, взаимодействия с другими G-белками также были отмечены. Аденозин является главным эндогенным агонистом всех четырех рецепторов, но инозин может также активировать рецептор A_3. Уровень аденозина, наблюдаемый в нормальных условиях, является достаточным, для того чтобы вызвать активацию всех четырех рецепторов и обеспечить взаимодействие с ними огромного количества лекарственных средств [28, 30, 36]. Аналитическая база биомоделирования на основе «клеточно-картируемой протеомики» включает в себя самые современные методы и подходы [2], представленные на рис. 6.12.

Оценка 900 GPCR-генов человека показала, что около 420 из них могут быть биомедицинским пространством действия рецепторов и целью воздействия лекарств. Несомненно, что фармакологи сфокусируют свои усилия на развитии известных ингибиторов или агонистов, действуя в области GPCR-рецепторов. По-видимому, это потребует 15 или 20 лет для разработки первых групп новых лекарств, изучения их действия, оценки безопасности и выведения на рынок. Но это сформирует новые взгляды на то, как контролировать действие GPCR. И если концепция обретет не только методологические, но чисто методические, практические оболочки, то прогресс в направленном моделировании и конструировании лекарств станет продуктивным и стремительным.

Предпосылкой этому является то, что некоторые формы поведения GPCR идеальны для биомоделирования при создании лекарств.

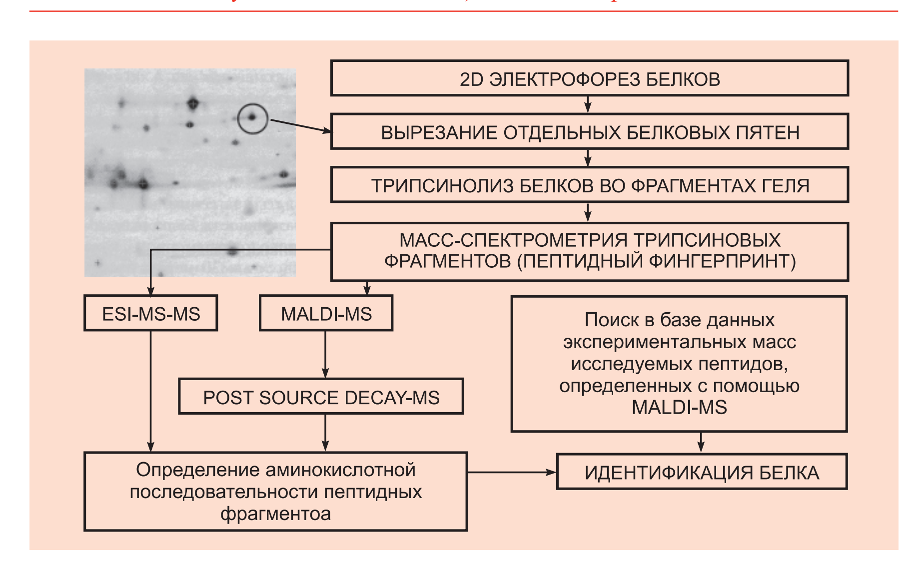
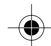


Рис 6.12. Возможности и последовательность проведения протеомного анализа [2], в том числе в целях поиска мишеней для инновационных лекарств




NB! Мембранные G-протеины формируют комплексы, которые функционируют как рецепторы, имеющие чувствительность, которой нет у отдельных компонент.

Эти комплексы участвуют в регуляции активности клетки и имеют способность откликаться на сигнал, который в других ситуациях они игнорировали. Индивидуальные протеины имеют свои программы в специфических генах, но эти комбинации рецепторов не всегда соответствуют простым программам поведения, на основе которых их поведение могло бы быть предсказано. Поэтому они должны быть рассмотрены как продукт «фантома» генов.

Через систему GPCR аденозин защищает ткани сердца и мозга от ишемических повреждений благодаря множеству субрецепторов. Активация рецепторов A_1 и, возможно, A_3 осуществляет профилактическую защиту сердца и других тканей от последующих ишемических повреждений. Аденозин также вызывает ингибирование пролиферации клеток лимфомы и является хемопротективным агентом, и это связано с активностью рецепторов A_1 и A_3 [29]. Агонисты рецепторов A_{2A} защищают ткани от повреждения путем уменьшения воспаления, возникающего во время кровоизлияний при ишемических повреждениях. Сходная кардиопротективная роль приписывается и рецептору A_3 [15].

Локализация рецепторов A_{2A} в областях стриатума и черной субстанции мозга, богатых дофамином, наводит на мысль о том, что ан-

тагонисты этого рецептора могут быть использованы в качестве адъюванта *дофаминэргических лекарств* при лечении болезни Паркинсона и шизофрении [24, 25].

Как известно, IgE антитела и тучные клетки играют центральную роль в патогенезе астмы. В тучных клетках присутствуют аденозиновые рецепторы A_{2B} и A_3, которые, будучи активированными, облегчают антигенобусловленную дегрануляцию тучных клеток. Использование неселективного антагониста аденозиновых рецепторов теофиллина широко применяется при лечении астмы, хотя механизм его действия на систему GPCR до конца не ясен.

Несмотря на большие успехи ученых, пока сравнительно мало лигандов GPCR используется в клинической практике. Собственно *аденозин* используют в некоторых странах для восстановления нормального сердечного ритма при тахикардии и в качестве вспомогательного средства при оценке степени поражения коронарной артерии на модели таллиевой интоксикации. В семидесятые годы метаболически стабильные агонисты аденозиновых рецепторов были протестированы как антигипертензивные средства, а в девяностых годах N-[(1S,транс)-2-гидроксициклопентил]-аденозин был проверен на добровольцах, как адъювант при терапии диабета второго типа. Другие вещества пока ждут своей очереди. Таким образом, рецепторы GPCR системы остаются притягательным объектом для открытия новых лекарственных средств.




Существенно важно, что новые рецепторы являются комплексной составляющей из двух или более GPCR. В других случаях они содержат GPCR и ко-протеин, не являющийся рецептором, но дающий рецептору предыдущий набор свойств. Например, рецептор для гормона, называемого амилин, похож на этот тип. Амилин модулирует воздействие на инсулин панкреатических и других клеток, но попытки идентифицировать простой протеин, который сохраняется как рецептор, потерпели неудачу. Анализ настоящих полных последовательностей генома человека показал, что для такого рецептора *нет гена.*

Однако комплекс существующих GPCR для гормона щитовидной железы, включающий кальцитонин плюс нерецепторный протеин и называемый RAMP (receptor activity modifying protein), откликается на амилин сильно и избирательно. Видимо, RAMP делает рецептор кальцитонина «многоязычным» – поэтому рецептор отзывается на кальцитонин, даже если клетки не содержат RAMP, но он тем более чувствителен к амилину, если клетки содержат RAMP.

Другой ко-протеин, называемый RCP (receptor component protein), воздействует на рецептор кальцитонина в соответствии с сигналом из

другой субстанции – CGRP (calcium-gene-related peptide), маленький белок, который наиболее известен как расширяющий кровеносные сосуды. Это особенно заметно во время беременности, когда уровень RCP и пептидов повышается в крови и плаценте. С повышением концентрации RCP *повышается количество рецепторов* кальцитонина. Они становятся чувствительны к явлениям дилатации сосудов, что усиливает запас крови в тканях плода [14].

Так как ко-протеины влияют на активность GPCR, они могут сами обеспечивать изменения *цели для лекарств*. Одной из интригующих целей является модулин, ко-протеин, который обволакивает рецепторы серотонина. В мозгу серотонин участвует в нейротрансмиссии.

NB! Лекарства, которые имитируют или ингибируют модулин, теоретически могут повысить или понизить отклик, например, специфических рецепторов серотонина на специфические типы клеток и стать перспективными в различных областях медицины: от лечения шизофрении до регуляции желудочно-кишечных функций.




Прозак и соответствующие антидепрессанты повышают уровни серотонина в мозге. Вне мозга он действует на кишечник и кровеносные сосуды. Неудивительно, что рецепторы серотонина имеют множество подтипов, и модулин в дальнейшем настраивает влияние серотонина на определенные клетки через иные подтипы чувствительности к ним.

Взгляд в будущее скрининга лекарств

Различные животные и люди по-разному реагируют на введение одного и того же лекарственного вещества. Эффекты лекарств зависят от их химической природы и взаимодействия между собой, возраста, функционального состояния органов, сопутствующей терапии. Вклад генетических факторов в вариабельность реакции составляет от 20 до 95% [8]. Различия ответа на лекарства обусловлены вариантами нуклеотидной последовательности генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств, молекулы-переносчики лекарств и рецепторы, взаимодействующие с лекарствами [1, 10]. Наследственная же детерминированность ответа остается постоянной на протяжении всей жизни индивида, как в человеческом сообществе, так и в животном мире [6].

Клинические наблюдения различий лекарственного воздействия впервые опубликованы в 1950-х годах. Теперь идентифицировано более 1,4 миллионов однонуклеотидных полиморфизмов в геноме человека. Более 60 000 находятся в кодирующих последовательностях ге-

нов, а некоторые из них ассоциированы с метаболизмом лекарств и ксенобиотиков и используются как тест-маркеры реакций организма [6, 8]. Эффекты лекарств представляют собой зачастую взаимодействие нескольких генных продуктов, которые влияют на их фармакокинетику и фармакодинамику.

Существенный вклад в эти процессы вносят и транспортные белки, в особенности *Р-гликопротеин*, кодируемый геном человека ABCB1 или MDR1

В гематоэнцефалическом барьере мозга Р-гликопротеин ограничивает аккумуляцию многих лекарств, включая дигоксин, ивергместин, винбластин, дексаметазон, циклоспорин, домперидон, лоперамид. С вариабельной экспрессивностью Р-гликопротеина в двенадцатиперстной кишке ассоциирован синонимичный *однонуклеотидный полиморфизм*, т.е. полиморфизм, который не меняет аминокислоту, в экзоне 26 (3435C$\rightarrow$T). Высокая биопригодность другого субстрата Р-гликопротеина – дигоксина – обнаружена у субъектов с генотипом 3435TT.

Однонуклеотидный полиморфизм связан с явлениями фармакокинетических вариаций, как в отдельных клетках крови, так и в целом организме. Вне всякого сомнения, эти синонимические процессы тесным образом сопряжены с системами G-белков, в ряду которых выделены 8 семейств (классы *А, В, С, Д, Е*, *орфаны*), идентифицированных по GPCR, и около десятка предполагаемых. В классе А, наряду с родопсином и мелатонином, находятся и нуклеотиды, а в классе *С* – глутамат и ГАМК-В. Поскольку более детальное обозначение семейства GPCR звучит как *гуанин – нуклеотид – обволакивающие пара-протеиновые рецепторы*, а роль нуклеотидов и, в частности, пиримидинов, вряд ли теперь требует дополнительных доказательств, приведем собственные данные в качестве альтернативной модели лиганд-рецепторных механизмов взаимодействия психотропных средств по связыванию с мембранами нервных клеток $[^{14}H]$ –*оротовой кислоты* и $[^{3}H]$ – *уридина.*




Эндогенные пиримидины обладают значительным сходством по химической структуре с молекулами некоторых психотропных препаратов [5, 7]. В то же время для уридина и оротовой кислоты, являющихся пиримидиновыми производными, выявлены анксиолитическая, антидепрессивная и другие виды психотропной активности. Для выяснения механизма психотропного действия этих веществ нами проведены эксперименты, целью которых явилось выяснение способности оротата калия и уридина взаимодействовать с рецепторными участками мембран нервной ткани (табл. 6.2).

Эксперименты проводились на крысах с применением радиоизотопных методов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что

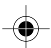
[^{14}H]-оротовая кислота не связывается с мембранами нервной ткани. Противоположные данные были получены для [^{3}H]-уридина, который обладал не только неспецифическим, но и специфическим связыванием с мембранами. Определение неспецифического связывания [^{3}H]-уридина проводили путем инкубации его с суспензией мембран в присутствии 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} и 10^{-7} М и немеченого уридина [7]. При концентрации немеченого уридина 0,1 ммоль/л и выше специфическое связывание было полностью ингибировано и оставалось лишь не специфическое связывание (табл. 6.2).

Таблица 6.2

Влияние концентрации немеченого уридина на связывание мембранами неокортекса [^{3}H]-уридина (концентрация [^{3}H]-уридина 71нМ/л, Т 4 °С)



Lg_c немеченого уридина	Количество связанного [^{3}H]-уридина, dpM на 1 нг белка
3,00	0,27±0,01
4,00	0,27±0,02
5,00	0,44±0,05
6,00	0,46±0,01
7,0	0,54±0,02



Обнаружено, что специфическое связывание не зависит от повышения температуры от +4 до +37°С. В то же время неспецифическое связывание увеличивалось в 4 раза и за счет этого суммарное связывание возрастало на 159%. Кроме того, выявлено, что специфическое связывание [^{3}H]-уридина достаточно слабое по сравнению с неспецифическим. Специфическое связывание увеличивается с ростом концентрации [^{3}H]-уридина (табл.6.3)

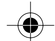
Изучение конкурентных взаимоотношений за места специфического связывания [^{3}H]-уридином группы психотропных препаратов показало, что диазепам, коразол и пирацетам проявляли тенденцию к вытеснению уридина с рецепторов. Медазепам, галоперидол и имипрамин достоверно снижали специфическое связывание [^{3}H]-уридина соответственно на 65, 61 и 82%. В присутствии NaCl вытеснение уридина бензодиазепиновыми транквилизаторами повышалось, что объясняется (если принять во внимание гипотезу о связывании уридина с бензодиазепиновыми рецепторами) возрастанием сродства бензодиазепинов к их рецепторам в присутствии хлорида натрия [12]. Наибольшая активность вытеснения уридина со специфических мест связыва-

ния была характерна для пентобарбитала [7], что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о большом сходстве пиримидинов с барбитуратами. О барбитуратах же известно, что они взаимодействуют с комплексом ГАМК-бензодиазепины – барбитуратные рецепторы [36].

Таблица 6.3

Концентрация и связывание [^{3}H]-уридина с белками мозга

Концентрация [^{3}H]-уридина	Связывание, dpM на 1 нг белка		
	суммарное	неспецифическое	специфическое
24	0,42±0,01	0,33±0,01	0,01±0,02
36	0,77±0,03	0,61±0,03	0,16±0,06
47	1,07±0,01	0,72±0,04	0,35±0,05
71	1,40±0,05	1,08±0,06	0,32±0,11
121	2,53±0,13	1,92±0,09	0,61±0,22
355	6,01±0,41	4,97±0,25	1,05±0,47




Кокаин и фенибут не изменяли специфического связывания [^{3}H]-уридина. Таким же действием обладали инозин и синтетическое производное пиримидина, условно названное РП-72. Последнее соединение при введении животным оказывало выраженное транквилизирующее действие. Тот факт, что инозин, связывающийся с бензодиазепиновыми рецепторами, и РП-72 не влияли на связывание уридина с мембранами, можно объяснить взаимодействием этих веществ и уридина с разными подтипами рецепторов бензодиазепинов. Хлорид натрия недостоверно повышал связывание уридина, при использовании ГАМК и галлюциногена МДФ было характерно достоверное усиление способности уридина связываться с мембранами (соответственно на 51 и 67%).

На рис. 6.13 представлены результаты сравнительного изучения влияния ряда психотропных препаратов на связывание уридина с его рецепторами. Видно, что некоторые из этих препаратов способны вытеснять [^{3}H]-уридин из его специфических мест связывания, то есть обладают сродством к этому рецептору. Наибольшая активность вытеснения была характерна для пентабарбитала. Меньшей способностью вытеснять уридин обладали имипрамин (82%), коразол (70%), медазепам (65%) и галоперидол (61%). Пирацетам, кокаин и инозин не обнаруживали статистически достоверного влияния на связывание уридина. Из представленных материалов следует, что большинство психотропных препаратов, несмотря на их принадлежность к различным

классам, взаимодействуют с одним рецептором, *лигандом* которого является *уридин*.

Известно, что в присутствии ГАМК и NaCl усиливается специфическое связывание большинства лигандов бензодиазепиновых рецепторов. Следовательно, выявленный нами факт подтверждает, что уридин является эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов. Из представленных материалов следует, что многие психотропные препараты, несмотря на их принадлежность к различным классам могут взаимодействовать с местами специфического связывания уридина. Общим видом воздействия обладают представители таких классов психотропных средств, как барбитураты, транквилизаторы, антидепрессанты, нейролептики и ноотропы.

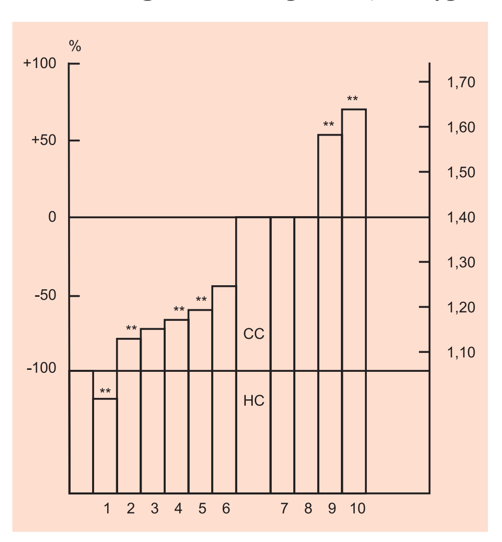


Рис. 6.13. Влияние веществ на связывание $[^3H]$-уридина с мембранами неокортекса крыс. СС-специфическое и НС-неспецифическое связывание (0,33 dpM на 1 нг белка). 1 – пентобарбитал; 2 – имипрамин; 3 – коразол; 4 – медазепам; 5 – галоперидол; 6 – пирацетам; 7 – кокаин; 8 – инозин; 9 – ГАМК; 10 – психогал. Все вещества применяли в концентрации 10^{-4} М/л. ** Достоверное различие ($p<0,05$). По ординате справа – связывание, dpM на 1 нг белка




К перечисленной группе можно отнести ГАМК, с рецепторами которой взаимодействует уридин. Можно сделать вывод, что уридин взаимодействует со всеми компонентами комплекса ГАМК-бензодиазепины-барбитуратный рецептор. Наличие у уридина специфических мест связывания с бензодиазепинами, также как и с имипрамином, позволяет отчасти вскрыть молекулярный механизм как анксиолитического, так и антидепрессивного компонентов в спектре психотропной активности уридина, выявленной нами. Во многом аналогичный спектр действия оротата калия осуществляется при его введении, по-видимому, за счет синтеза из оротовой кислоты уридина, который действует на уровне рецепторов трансмембранных белков системы GPCR.

Резюмируя изложенное, можно полагать, что развитие протеомных технологий, позволяющее осуществить контроль обратимой посттрансляционной модификации белков специфическими фермента-

ми и фармакологическими средствами, открывает широкую дорогу в *фармакопротеомике*. Этому способствует внедрение компактных *чипов* с иммобилизированными белками, взаимодействия с которыми выявляются флюоресцентными красителями или с помощью иммунохимического анализа [2]. Это позволяет сделать следующий шаг от ПЦР к анализу белковых полей (рис. 6.14).

Как известно, технологический процесс не стоит на месте, тем более в фармакологии. Большое разнообразие фармакологических моделей делает эту науку поистине синтетической. Протеомные исследования продвигаются с удивляющей быстротой. Маркерные линии «известных» белков, способных флюоресцировать в живых клетках, позволили получить линии мышей, содержащих зеленый (GFP), красный (RFP) и синий или циановый белок (BFP) и установить их промоторы. Это позволяет не только визуализировать фармакологические феномены, но и устанавливать экстраполяционные параллели между *in vitro*- и *in vivo* - исследованиями в фармакопротеомике.

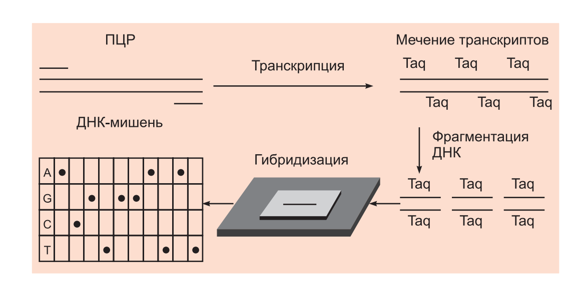
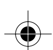


Рис. 6.14. Комбинация ПЦР с методом гибридизации, используемая для создания ДНКовых микрополей [2], позволяет получить ДНК-чипы для фармакопротеомных исследований и скрининга инновационных лекарств

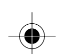



По-видимому, в дальнейшем будет предложено немало новых моделей для скрининга принципиально новых лекарств через рецепторику системы GPCR. Но приведенная здесь модель была отработана нами в 80-х годах прошлого столетия и стала базой для направленного синтеза, изучения и последующего предложения для медицинского применения таких препаратов, как триметидон, бромпиримин, йодпиримин и другие. Важно то, что эта модель позволила выявить, наряду с регенерирующими, лейкопоэтическими и фагостимулирующими свойствами, значительные психотропные эффекты, которые вкупе, вне всякого сомнения, реализуются через GPCR систему.

Литература

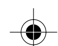
1. *Аляутдин Р.Н., Кройтер Й., Харкевич Д.А.* Доставка лекарственных препаратов в мозг с помощью наночастиц // *Эксперим. и клин. фармакология № 2, 2004.*

2. *Арчаков А.И.* Геномика, протеомика и биоинформатика – науки XXI столетия // *Медицинская кафедра, № 3, с. 6-13, 2002.*
3. *Ахапкина В.И.* Нейромодуляторная концепция и обоснование создания нового класса нейротропных лекарственных средств // *XIV Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство».. – М., с.266, 2007.*
4. *Захаров А.В., Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В.* Прогноз количественных свойств химических соединений на основе QNA дескрипторов // *XIV Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». – М., с.285, 2007.*
5. *Каркищенко Н.Н.* Инновационные лекарства и нелетальные технологии // *Биомедицина, № 3, с.5-21, 2006.*
6. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – *М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 608 с., 2004.*
7. *Каркищенко Н.Н.* Психоунитропизм лекарственных средств. – *М.: Медицина, 205 с., 1993.*
8. *Серединин С.Б.* Лекции по фармакогенетике. – *М.: МИА, 303 с, 2004.*
9. *Утешев Д.Б., Коростелев С.А., Сергеев А.В., Утешев Б.С.* Антисмысловые олигонуклеотиды – принципиально новый класс биологически активных молекул // *Экспериментальная и клиническая фармакология № 4, 2004.*
10. *Харкевич Д.А.* Венотропные (флеботропные) средства // *Экспериментальная и клиническая фармакология, № 1, 2004.*
11. *Altiok N., Balmform A.J., Fredholm B.B.* Adenosine A_1 receptor-induced cAMP changes in d384 astrocytoma cells and the effect of bradikinin thereon // *Acta Physiol. Scand., 144, pp. 55-63, 1992.*




12. *Altiok N., Fredholm B.B.* Bradykinin inhibition of cyclic AMP accumulation in d384 astrocytoma cells. Evidence against a role of cyclic GMP // *Neurochem. Int., 21, pp. 209-213, 2001.*
13. *Auchampach J.A., Gross G.J.* Adenosine A_1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs // *Am. J. Physiol., 264, pp. H1327-H1336, 2005.*
14. *Baraldi P.G., Cacciari B., Merighi S. et al.* A(3) adenosine receptor ligands: history and perspectives // *Med. Res. Rev., 20, pp.103-128, 2000.*
15. *Baraldi P.G., Zaid A.N., Lampronti I. et al.* Synthesis and biological effects of a new series of 2-amino-3-benzoylthiophenes as allosteric enhancers of A_1-adenosine receptor // *Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, pp. 1953-1957, 2000.*
16. *Berretta S., Robertson H.A., Graybiel A.M.* Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum // *J. Neurophysiol., 68, pp. 767-777, 2007.*
17. *Brown R., Ollerstam A., Johansson B. et al.* Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma rennin in adenosine A_1 receptor-deficient mice // *Am. J. Physiol., 281, pp. R1362-R1367.*
18. *Bruns R.F., Fegrus J.H.* Allosteric enhancement of adenosine A_1 receptor binding and function by 2-amino-3- benzoylthiophenes // *Mol. Pharmacol., 38, pp. 939-949, 1990.*

19. *Chen J.F., Moratalla R., Impagnatiello F. et al.* The role of the D_2 dopamine receptor (D_2R) in A_{2A} adenosine receptor ($A_{2A}R$)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A_{2A} and D_2 receptor knockout mice // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A, 98, pp. 1970-1975, 2001.*
20. *Chen M.-L., Patnaik R., Hauck W.W. et al.* An individual bioequivalence criterion: Regulatory consideration // *Stat. Med. V. 19, 20, pp. 2821-2842, 2000.*
21. *Cronstein B.N.* Adenosine A_2, endogenous anti-inflammatory agent // *J. Appl. Physiol., 76, p. 5-13, 1994.*
22. *Cunha R.A., Dunwiddia T.V., Constantino M.D. et al.* Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A_{2A} receptor agonist [^{3}H] CGS 21680 in the rat hippocampus and different from striatal A_{2A} receptors // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 353, pp. 261-271, 1996.*
23. *Deckert J., Gleiter C.H.* Pyrimidine endodenous neuroprotective metabolite and neuromodulator // *J. Neural. Transm. Suppl., 43, pp. 32-31, 1994.*
24. *Delaney S.M., Geiger J.D.* Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism // *J. Pharmacol. Exp. Ther., 285, pp. 568-572, 1998.*
25. *Delaney S.M., Shepel P.N., Geiger J.D.* Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals // *J. Pharmacol. Exp. Ther., 285, pp. 561-567, 2003.*




26. *Dunwiddia T.V., Fredholm B.B.* Adenosine neuromodulation // *Purinergis Approaches in Experimental Therapeutics (Eds. Jacobson K.A. and Jarvis M.F.) pp. 359-382, 1997.*
27. *Dunwiddia T.V., Masino S.A., Poelchen W. et al.* Altered electrophysiological sensitivity to A1 but not GABAβ agonists in the hippocampal CA1 region in adenosine A1 receptor knockout mice // *Society for Neuroscience, 26, pp. 816-818, 2000.*
28. *Ferre S., Popoli P., Gimenez-Llort L. et al.* Postsynapsic antagonistic interaction between adenosine A_1 and dopamine D_1 receptos // *Neuroreport, 6, pp. 73-76, 1994.*
29. *Ferre S., Torvinen M., Antoniou K. et al.* Adenosine A1 receptor mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells // *J. Biol. Chem., 273, pp. 4718-4724, 1998.*
30. *Kenakin T.A* Pharmacology Primer: Theory, Application, and Methods. – *Academic Press [Elsevier], 2003.*
31. *Kim G., Okumura M., Bosnakovski D. et al.* Biological properties of allogenic articular chondrocytes on the surface of bovine cartilage explants *in vitro* // *J. of Veterinary Medicine - Series A 50, 418-423, 2003.*
32. *de Mendonca A., Ribeiro J.A.* Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus // *Brain Res. 606: pp. 351-356, 1993.*
33. *de Mendonca A., Sebastiano A.M., Ribeiro J.A.* Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurons by adenosine A_1 receptor activation. *Neuroreport, 6, p.1097-1100.*

34. *Peck C.C., Brown D.D., Sheiner L.B. et al.* A microcomputer program which assists and teaches physicians // *In: Proc. 4-th Annual Conf. on Computers in Medical Care. / J.T. O'Neill, ed., v. 2, p. 988, 1980.*
35. *Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D. et al.* MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs // *Nat .Med.;5:1048-1051,1999.*
36. *Winchilli V.M., Elswick R.K.* The multivariante assessment of distributions // *J. Royal. Stat. V. 7, 1, pp. 444-460, 2007.*
37. *Zashke E.L.* Modeling of physiological wave pattern in pharmacology // *J. Clinical and Exp.Pharm. V. 21, 9, pp. 426-439, 2007.*

